



REC'D 28 JAN 2005
WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 30 NOV. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété Industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354*03

BR1

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire 08 540 0 1 / 210202

| | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Réservé à l'INPI | | |
| REMISE DES PIÈCES DATE 19 NOV 2003 LIEU 75 INPI PARIS 34 SP 0313555 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 19 NOV. 2003 Vos références pour ce dossier <i>(facultatif)</i> CP 61158-1820 | | 1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet ARMENGAUD AINE 3, Avenue Bugeaud 75116 PARIS |
| Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie | | |
| 2 NATURE DE LA DEMANDE <ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> Demande de brevet <input type="checkbox"/> Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/> Demande divisionnaire <i>Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale</i> | | Cochez l'une des 4 cases suivantes |
| | | <input checked="" type="checkbox"/> N° Date <input type="text"/> |
| | | <input type="checkbox"/> N° Date <input type="text"/> |
| | | <input type="checkbox"/> N° Date <input type="text"/> |
| Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i> | | |
| | | |
| 3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) "NOUVEAUX MOYENS POUR LA PREVENTION DES LEISHMANIOSES" | | |
| 4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE | | <input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite» |
| 5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases) | | <input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique |
| Nom ou dénomination sociale | | INSTITUT DE LA RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (I.R.D) |
| Prénoms | | |
| Forme juridique | | |
| N° SIREN | | <input type="text"/> |
| Code APE-NAF | | <input type="text"/> |
| Domicile ou siège | Rue | 213, Rue de Lafayette |
| | Code postal et ville | 75148 PARIS CEDEX 10 |
| | Pays | FRANCE |
| Nationalité | | Française |
| N° de téléphone (facultatif) | | N° de télécopie (facultatif) |
| Adresse électronique (facultatif) | | |
| <input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite» | | |

Remplir impérativement la 2^{me} page

BEST AVAILABLE COPY

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

| | | |
|------------------------------|--|---------------------|
| REMETTEUR DES PIÈCES | | Réervé à l'INPI |
| DATE | | 19 NOV 2003 |
| LIEU | | 75 INPI PARIS 34 SP |
| N° D'ENREGISTREMENT | | 0313555 |
| NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI | | |

DB 540 W / 210502

| | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6 MANDATAIRE (s'il y a lieu) | | |
| Nom | | PEAUCELLE |
| Prénom | | Chantal |
| Cabinet ou Société | | Cabinet ARMENGAUD AINE |
| N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel | | 92-1189 |
| Adresse | Rue | 3, Avenue Bugeaud |
| | Code postal et ville | 17 51116 PARIS |
| | Pays | FRANCE |
| N° de téléphone (facultatif) | | 01-45-53-05-50 |
| N° de télécopie (facultatif) | | 01-45-53-80-21 |
| Adresse électronique (facultatif) | | armengau@club-internet.fr |
| 7 INVENTEUR (S) | | Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques. |
| Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes | | <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s) |
| 8 RAPPORT DE RECHERCHE | | Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) |
| Établissement immédiat ou établissement différé | | <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |
| Paiement échelonné de la redevance (en deux versements) | | Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non |
| 9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES | | Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |
| 10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS | | <input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences |
| Le support électronique de données est joint | | <input type="checkbox"/> |
| La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe | | <input type="checkbox"/> |
| Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes | | |
| 11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) | | VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI |
| Mandataire : Chantal PEAUCELLE 92-1189 Paris, le 19 novembre 2003 | |   |

Nouveaux moyens pour la prévention des *leishmanioses*

5 L'invention a pour objet de nouveaux moyens pour la prévention des *leishmanioses* chez l'animal et chez l'homme.

Elle vise en particulier des molécules d'acides nucléiques codant pour des facteurs de virulence ou de pathogénicité chez *Leishmania* et leur utilisation pour produire de tels facteurs afin d'élaborer des compositions vaccinales contre les *leishmanioses*.

10 Les *leishmanioses* représentent l'une des six maladies parasitaires majeures et sont considérées, à ce titre, comme prioritaires par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S). Les leishmanies existent sous la forme promastigote extracellulaire, à l'intérieur du tube digestif de l'insecte vecteur (le phlébotome), et sous la forme amastigote intracellulaire, chez l'hôte mammifère. Plusieurs molécules, dont les

15 lypophosphoglycanes (LPG) ou une métalloprotéase appelée gp63, semblent jouer un rôle important dans le pouvoir infectieux et la pathogénicité du parasite. Plus récemment, une famille de glycoprotéines appelées antigènes de surface de promastigotes, PSA (pour "Promastigote Surface Antigens"), a suscité un intérêt nouveau. Ces PSA sont caractérisées par la présence de motifs répétés riches en

20 leucine pouvant intervenir dans les interactions de type protéine/protéine et confèrent une immunité protectrice à médiation cellulaire de type Th 1 chez la souris. Chez des organismes, tels que les bactéries ou les plantes, il est apparu que les PSA étaient impliquées dans des fonctions comme l'adhésion cellulaire, la résistance aux pathogènes et la transduction de signaux.

25 Cependant, aucun rôle biologique n'a été décrit, ni suggéré, chez *Leishmania*.

Ce rôle a pu être étudié par les inventeurs grâce à la technique qu'ils détiennent pour cultiver des promastigotes et des amastigotes de *Leishmania* dans des conditions asériques et axéniques, avec un milieu totalement défini, c-à-d dont les constituants sont tous identifiés, et qui fait l'objet du brevet FR 93 05 779 du 13 mai 1993 au nom

30 de l'IRD (ex. ORSTOM). La maîtrise de ce procédé leur permet de disposer de formes parasitaires dépourvues des contaminants apportés jusqu'alors par les

milieux de culture, et de déterminants antigéniques sous une forme hautement purifiée.

Dans ledit brevet FR de la Demanderesse, on a déjà décrit l'isolement et l'identification d'une PSA excrétée/secrétée (antigène d'excrétion/secrétion ou AES

5 en abrégé) de 38 kDa et de 45 kDa dans le surnageant de culture de *L. amazoniensis*.

Les inventeurs ont à présent isolé et cloné l'ADNc codant pour cette protéine et procédé à l'évaluation de son rôle dans la biologie du parasite en mettant au point une stratégie de transgénèse additionnelle. Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'implication de cette PSA en tant que facteur de virulence et/ou de
10 pathogénicité et d'élaborer des constructions permettant de surexprimer le gène de *Leishmania* codant pour cette PSA, ce qui permet de développer des moyens pour l'obtention de compositions vaccinales contre les *leishmanioses*.

L'invention a donc pour but de fournir des séquences d'acides nucléiques capables de coder pour des PSA de formes promastigotes et de formes amastigotes de
15 *Leishmania*, constituant des facteurs de virulence et/ou de pathogénicité.

Elle vise tout particulièrement à fournir des vecteurs de surexpression de ces PSA, ainsi que des parasites génétiquement modifiés.

L'invention vise en outre les surnageants des milieux de culture des PSA obtenues, ainsi que les PSA isolées, purifiées, et la mise à profit de leurs propriétés pour
20 élaborer des compositions vaccinales contre les *leishmanioses*.

Les séquences d'acides nucléiques de l'invention correspondent à des acides nucléiques isolés capables de coder pour une PSA de formes promastigotes ou de formes amastigotes de *Leishmania*, lesdits acides nucléiques répondant à l'une des séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5.

25 Les séquences d'acides nucléiques de l'invention sont plus spécialement des séquences de clones d'ADNc appartenant à une famille répondant aux caractéristiques illustrées par la figure 2 et comprenant en particulier un site de restriction *Sall* et deux sites de restriction *HindIII*, avec un codon stop situé en aval du premier site *HindIII*.

L'invention vise en particulier les clones d'ADNc de ladite famille comportant un site de restriction *EcoRV* et/ou *PstI* entre les deux sites *SalI* et *HindIII*, ou de part et d'autre du site *SalI*.

5 L'invention vise également les protéines immunogènes isolées, caractérisées en ce qu'elles présentent une séquence telle que codée par les acides nucléiques définis ci-dessus.

Ces protéines appartiennent à la famille dite des antigènes de surface de promastigotes (PSA en abrégé) et possèdent des régions caractéristiques illustrées sur les figures 3A et 3B. Ces protéines peuvent être modifiées post-10 traductionnellement par des N-glycosylations, phosphorylations et l'ancrage d'un GPI. Elles possèdent un peptide signal hydrophobe en position carboxy-terminale.

Par clonage directionnel des séquences définies ci-dessus dans un vecteur d'expression, les inventeurs ont obtenu des constructions permettant de les exprimer en position sens.

15 L'invention vise donc des constructions d'acides nucléiques, caractérisées en ce qu'elles comportent des acides nucléiques isolés en position sens, capables de coder pour une protéine immunogène de formes promastigotes ou de formes amastigotes de *Leishmania* répondant à l'une des séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5.

20 L'invention vise notamment les constructions d'acides nucléiques comportant des séquences de clones d'ADNc appartenant à une famille répondant aux caractéristiques illustrées par la figure 2 et comprenant en particulier un site de restriction *SalI* et deux sites de restriction *HindIII*, avec un codon stop situé en aval du premier site *HindIII*.

25 Les clones d'ADNc comportant un site de restriction *EcoRV* et/ou *PstI* entre les deux sites *SalI* et *HindIII*, ou de part et d'autre du site *SalI* sont particulièrement préférés.

Des constructions particulièrement avantageuses comportent comme séquences d'acides nucléiques, une séquence choisie parmi SEQ ID N°6 à SEQ ID N°10.

30 Des constructions préférées comportent lesdites séquences d'acides nucléiques dans un plasmide à multiplication rapide tel que pTex.

L'invention vise en particulier les clones d'ADNc de ladite famille comportant un site de restriction *EcoRV* et/ou *PstI* entre les deux sites *SalI* et *HindIII*, ou de part et d'autre du site *SalI*.

L'invention vise également les protéines immunogènes isolées, caractérisées en ce 5 qu'elles présentent une séquence telle que codée par les acides nucléiques définis ci-dessus.

Ces protéines appartiennent à la famille dite des antigènes de surface de promastigotes (PSA en abrégé) et possèdent des régions caractéristiques illustrées sur les figures 3A et 3B. Ces protéines peuvent être modifiées post-10 traductionnellement par des N-glycosylations, phosphorylations et l'ancre d'un GPI. Elles possèdent un peptide signal hydrophobe en position carboxy-terminale.

Par clonage directionnel des séquences définies ci-dessus dans un vecteur d'expression, les inventeurs ont obtenu des constructions permettant de les exprimer en position sens.

15 L'invention vise donc des constructions d'acides nucléiques, caractérisées en ce qu'elles comportent des acides nucléiques isolés en position sens, capables de coder pour une protéine immunogène de formes promastigotes ou de formes amastigotes de *Leishmania* répondant à l'une des séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5.

20 L'invention vise notamment les constructions d'acides nucléiques comportant des séquences de clones d'ADNc appartenant à une famille répondant aux caractéristiques illustrées par la figure 2 et comprenant en particulier un site de restriction *SalI* et deux sites de restriction *HindIII*, avec un codon stop situé en aval du premier site *HindIII*.

25 Les clones d'ADNc comportant un site de restriction *EcoRV* et/ou *PstI* entre les deux sites *SalI* et *HindIII*, ou de part et d'autre du site *SalI* sont particulièrement préférés.

Des constructions particulièrement avantageuses comportent comme séquences d'acides nucléiques, une séquence choisie parmi SEQ ID N°1 à SEQ ID N°5.

Des constructions préférées comportent lesdites séquences d'acides nucléiques dans

30 un plasmide à multiplication rapide tel que pTex.

Elle vise également les souches de *Leishmania* transfectées par de telles constructions qu'il s'agisse de formes promastigotes, ou de formes amastigotes.

Des souches transfectées préférées, compte tenu des applications vaccinales visées, sont des souches de *L.infantum*.

- 5 De manière avantageuse les PSA sont produites en grande quantité, de manière constitutive, dans les parasites.

L'invention vise également un procédé de transfection d'un parasite de *Leishmania*, caractérisé en ce qu'on introduit dans le parasite de *Leishmania* un vecteur tel que défini plus haut, comportant un marqueur, on sélectionne les parasites transfectés

- 10 grâce audit marqueur, on les met en culture dans un milieu axénique et asérique totalement défini et on récupère le surnageant de culture qui renferme les protéines immunogènes présentes dans des concentrations de l'ordre de 10 à 20 fois supérieures à celle produite par la souche mère de *Leishmanie*.

- 15 L'introduction du vecteur dans le parasite est par exemple réalisée par électroporation.

L'insertion de ces acides nucléiques dans les parasites permet d'augmenter le pouvoir infectieux de ces derniers : leur capacité à survivre dans le macrophage infecté et à s'y multiplier est supérieure jusqu'à 5 fois celle du parasite non transfектé par de tels acides nucléiques.

- 20 Lesdites PSA sont produites en grande quantité dans le surnageant du milieu de culture des parasites. L'invention vise donc également les surnageants des milieux de cultures desdits parasites génétiquement modifiés, ainsi que les PSA isolées à partir de ces surnageants et purifiées.

- 25 L'invention fournit ainsi des moyens de grand intérêt pour répondre à la demande industrielle de disposer de quantités importantes de protéines constituant des facteurs de virulence/pathogénicité chez les *Leishmanies*.

- Grâce à leur pouvoir immunogène, ces protéines permettent d'obtenir, après immunisation d'animaux selon des techniques classiques, des anticorps polyclonaux et d'élaborer des anticorps monoclonaux. L'immunisation de souris a ainsi permis 30 d'obtenir des anticorps anti Ig G2A et celle de chien des anticorps IgG2.

L'invention vise donc également de tels anticorps et mise à profit de leurs propriétés pour élaborer à une échelle exportable industriellement des compositions vaccinales contre les *leishmanies* chez l'homme ou animal.

Les applications diagnostiques de ces anticorps font également partie de l'invention.

- 5 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention seront donnés dans les exemples qui suivent dans lesquels il sera fait référence aux figures 1 à 6 , qui représentent, respectivement :
- la figure 1, l'alignement en 3ⁱ des séquences nucléotidiques de clones d'ADNc selon l'invention ;
 - 10 - la figure 2, un schéma récapitulatif des séquences nucléotidiques des clones d'ADNc obtenus après criblage immunologique par un anticorps monoclonal anti-AES des banques d'expression des formes promastigotes et des formes amastigotes de *L. amazonensis*. Les sites des enzymes de restriction sont indiqués au-dessus de chaque séquence ;
 - 15 - la figure 3A, la localisation de différentes régions protéiques, caractérisées par leur composition particulière en acides aminés, présentes sur la séquence protéique déduite de l'ADNc du clone A3B, et la figure 3B une représentation schématique de la séquence protéique déduite de l'ADNc du clone A3B codant pour une PSA ;
 - la figure 4, les analyses des transcrits par RT-PCR chez les formes promastigotes (P) et amastigotes (A) ;
 - 20 - la figure 5, le niveau de production de la protéine par western-blotting, à l'aide d'un anticorps anti-PSA, et
 - la figure 6, l'effet de la surexpression d'une PSA de *L. amazonensis* sur le pouvoir infectieux des parasites.

25

1 - Caractérisation moléculaire des immunogènes majeurs des AES des formes promastigotes et amastigotes de *L. amazonensis*. (*Lma* en abrégé)

Cette caractérisation a été effectuée en criblant des banques d'expression d'ADNc des formes promastigotes et des formes amastigotes de *L. amazonensis* à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'immunogène majeur des AES.

- Caractéristiques des banques d'ADNc :

Deux banques d'expression d'ADNc, respectivement de formes promastigotes, et de formes amastigotes de *L. amazonensis* ont été réalisées. Les caractéristiques de ces banques sont présentées au tableau I. Les parasites de phase exponentielle et stationnaire ont été mélangés afin d'avoir accès aux différents transcrits pouvant être exprimés au cours des différentes étapes de leur culture *in vitro*. 5×10^4 phages par banque ont ensuite été criblés immunologiquement avec l'anticorps monoclonal F5 dilué au 1/500^{ème}. L'obtention de cet anticorps fait l'objet de l'exemple dans le brevet FR mentionné ci-dessus.

Tableau I

| Banque d'ADNc Lma LES J4 + J7 | Promastigotes | Amastigotes |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|
| récoltes J4 + J7 | $7,8.10^9$ | $7,8.10^9$ |
| Titration après packaging | 350 000 | 500 000 |
| Titre après amplification | $8,32.10^7$ ph/ul | $2,16.10^8$ ph/ul |

J4 + J7 = parasites récoltés au 4^{ème} jour, en phase exponentielle, et au 7^{ème} jour, en phase stationnaire de leur croissance.

- Isolement et séquencage des clones reconnus par l'anticorps monoclonal F5

13 clones de la banque promastigote et 11 clones se sont révélés positifs de la banque amastigote se sont révélés positifs. Tous ces clones ont été isolés par criblage secondaire et tertiaire.

L'ADN plasmidique de l'ensemble des clones isolés a été analysé après différentes digestions enzymatiques et les ADNc possédant des inserts de plus grande taille, par digestion *EcoRI/XbaI*, ont été retenus afin d'éliminer les ADNc trop tronqués en 5'.

Comme le montre le tableau II, les clones 1A1, 1B1, 2B3, 2C1, 2D1 et 2E1 de la banque d'ADNc de promastigotes et les clones A3B, V4A, V5, W2 et W3 de la banque d'amastigotes présentent les inserts de plus grande taille.

L'analyse de ces clones, en déterminant la présence ou non de deux sites d'enzymes de restriction (*HindIII* et *Sall*) préalablement sélectionnés, a montré qu'ils présentaient une forte homologie de leur séquence nucléotidique.

Par double digestion *HindIII/SalI*, trois classes différentes de clones ont été mises en évidence avec un fragment *HindIII/SalI* d'une taille, respectivement, inférieure à 400 pb (clone 2G1), de 500 pb (clones de type 2C1 et A3B) ou de 600 pb (clones de type 1A1 ou W2). Ainsi cinq types de clones, choisis selon les caractéristiques particulières de leur ADN (la taille de l'insert et la localisation de certains sites d'enzyme de restriction) sont représentés en caractère gras dans le tableau II.

Tableau II

Banque d'ADNc de promastigotes de *Lma*

| Clones ADNc | 1A1 | 1B1 | 1C1 | 1D5 | 1F1 | 2A2 | 2B3 | 2C1 | 2D1 | 2E1 | 2F1 | 2G1 | B3 A |
|-----------------------------------------------|-----|-----|-------|-----|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|-------|---------|
| Taille des inserts | | | | | | | | | | | | | |
| EcoRI/Xhol (kb) | 2,5 | 2,5 | 2-2,2 | 0,5 | 2 | 2(>) | 2,5 | 2,4 | 2,4 | 2,4 | 2 | 1,7-2 | 1,7 |
| Carte de restriction | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Sall</i> | O | O | O | N | N | N | O | O | O | O | N | O | N |
| <i>Hind</i> III | 1,1 | 1,1 | 1,1 | / | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| <i>Hind</i> III/ <i>Sall</i> (pb) | 600 | 600 | 500 | N | N | N | 600 | 500 | 500 | 500 | N | <400 | N |
| Expression de protéine recombinant e | | | | | | | | | | | | | |
| (kDa) | 45 | / | 40 | / | / | / | / | 42,5 | / | / | 39 | ? | 18 |

10 Banque d'ADNc amastigotes de *Lma*

| | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------------|------|-------|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| EcoRI/Xhol (kb) | 2,3 | 2-2,2 | 2,2 | ? | 2,3 | 2,3 | 2 | 2 | 2,3 | 2,2 | 1,7 |
| Carte de restriction | | | | | | | | | | | |
| <i>Sal</i> II | O | O | O | N | O | O | N | N | O | O | N |
| <i>Hind</i> III | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| <i>Hind</i> III/ <i>Sal</i> II (pb) | 505 | 500 | 500 | N | 500 | 500 | N | N | 600 | 500< | N |
| Expression de protéine recombinante | | | | | | | | | | | |
| (kDa) | 42,5 | / | 36,5 | / | 36,5 | 43 | / | / | 45 | / | / |

O= oui, pour site présent ; N= non, pour site absent ; / = réalisé ; ? = résultat non obtenu.

Le tableau II donne également les résultats relatifs à la capacité des clones à exprimer une protéine recombinante. L'IPTG a été utilisé comme agent d'induction. Les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE et immunoblot en présence de l'anticorps anti-AES des formes promastigotes et/ou des formes amastigotes, préalablement absorbé en présence de lysat de *E. coli*. On obtient des résultats équivalents. On note pour les clones d'intérêt l'expression de différentes protéines recombinantes allant de 42,5 kDa de poids moléculaire apparent (clone 2C1), à 43 kDa (clone A3B) ou 45 kDa (1A1 et W2).

On rapporte sur le document "Listage des séquences", les résultats du séquençage :

- des trois types de clones suivants de la banque promastigote :
- . le clone de type 1A1 (SEQ ID N°8), qui exprime une protéine de plus grand poids moléculaire. Les clones de type 1B1 et 2B3 sont du même type que ce clone ;
- . le clone 2C1 (SEQ ID N°2), qui exprime une protéine recombinante de poids moléculaire inférieur à celle du clone 1A1 ;
- . le clone 2G1 (SEQ ID N°9), qui a la particularité de posséder un petit fragment *Hind*III/*Sal*II ;

| | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------------|------|-------|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| EcoRI/Xhol (kb) | 2,3 | 2-2,2 | 2,2 | ? | 2,3 | 2,3 | 2 | 2 | 2,3 | 2,2 | 1,7 |
| Carte de restriction | | | | | | | | | | | |
| <i>Sall</i> | O | O | O | N | O | O | N | N | O | O | N |
| <i>HindIII</i> | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| <i>HindIII/Sall</i> (pb) | 505 | 500 | 500 | N | 500 | 500 | N | N | 600 | 500< | N |
| Expression de protéine recombinante | | | | | | | | | | | |
| (kDa) | 42,5 | / | 36,5 | / | 36,5 | 43 | / | / | 45 | / | / |

O= oui, pour site présent ; N= non, pour site absent ; / = réalisé ; ? = résultat non obtenu.

Le tableau II donne également les résultats relatifs à la capacité des clones à exprimer une protéine recombinante. L'IPTG a été utilisé comme agent d'induction. Les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE et immunoblot en présence de l'anticorps anti-AES des formes promastigotes et/ou des formes amastigotes, préalablement absorbé en présence de lysat de *E. coli*. On obtient des résultats équivalents. On note pour les clones d'intérêt l'expression de différentes protéines recombinantes allant de 42,5 kDa de poids moléculaire apparent (clone 2C1), à 43 kDa (clone A3B) ou 45 kDa (1A1 et W2).

On rapporte sur le document "Listage des séquences", les résultats du séquençage :

- des trois types de clones suivants de la banque promastigote :
- .. le clone de type 1A1, qui exprime une protéine de plus grand poids moléculaire. Les clones de type 1B1 et 2B3 sont du même type que ce clone ;
- .. le clone 2C1 (SEQ_ID N°2), qui exprime une protéine recombinante de poids moléculaire inférieur à celle du clone 1A1 ;
- .. le clone 2G1, qui a la particularité de posséder un petit fragment *HindIII/Sall* ;
- des deux clones suivants de la banque amastigote :

- des deux clones suivants de la banque amastigote :

. les clones de type A3B (SEQ ID N°6), qui expriment une protéine recombinante d'environ 43 kDa et possèdent un fragment *HindIII/SalI* de 500 pb, le clone V5 apparaissant identique. Les clones V2D et V4A sont considérés comme des clones

5 tronqués du même type ;

. le clone W2 (SEQ ID N°10), qui exprime une protéine recombinante de 45 kDa et qui présente un fragment *HindIII/SalI* de 600 pb.

. Etude des cinq séquences d'ADNc

10

L'alignement des cinq séquences d'ADNc obtenues est représenté à la figure 1 où les différences entre ces clones sont seulement dues à la présence d'une séquence tronquée en 5' et/ou l'insertion de séquences d'environ 72 nucléotides du côté 5'. Les clones présentent ainsi une (clones 2C1 et A3B) ou trois (clones 1A1 et W2) insertions.

15

Hormis ces zones d'insertions, les clones présentent des homologies de l'ordre de 99% et peuvent être considérés comme appartenant à une famille d'ADNc. Seul le clone A3B possède le codon ATG d'initiation, les autres clones étant tronqués en 5'. Cependant l'ADNc A3B ne possède pas la séquence de 39 nt codant pour le "splice leader" retrouvée en 5' sur tous les ARNm de *Leishmania*.

20

Les ADNc des clones A3B et 2C1 présentent une homologie quasi totale et sont donc considérés comme identiques, l'ADNc du clone 2C1 correspondant à une partie tronquée en 5' de l'ADNc du clone A3B.

Le clone A3B, représentatif de cette famille a fait l'objet d'un séquençage entier dans les deux sens.

25

On a rapporté sur la figure 2 les sites des enzymes de restrictions pour chacun de ces clones.

Les séquences SEQ ID N°6 à 10, correspondent respectivement à celles des ADNc de A3B, 2C1, 1A1, 2G1, W2.

- Analyse des différentes séquences protéiques déduites

30

La traduction des différentes séquences d'ADNc en séquences protéiques a été réalisée en choisissant le cadre de lecture correspondant à celui suggéré par la

- . les clones de type A3B, qui expriment une protéine recombinante d'environ 43 kDa et possèdent un fragment *HindIII/SalI* de 500 pb, le clone V5 apparaissant identique.
 - Les clones V2D et V4A sont considérés comme des clones tronqués du même type ;
 - . le clone W2, qui exprime une protéine recombinante de 45 kDa et qui présente un fragment *HindIII/SalI* de 600 pb.
- 5

Etude des cinq séquences d'ADNc

L'alignement des cinq séquences d'ADNc obtenues est représenté à la figure 1 où les 10 différences entre ces clones sont seulement dues à la présence d'une séquence tronquée en 5' et/ou l'insertion de séquences d'environ 72 nucléotides du côté 5'. Les clones présentent ainsi une (clones 2C1 et A3B) ou trois (clones 1A1 et W2) insertions. Hormis ces zones d'insertions, les clones présentent des homologies de l'ordre de 99% et peuvent être considérés comme appartenant à une famille d'ADNc. Seul le 15 clone A3B possède le codon ATG d'initiation, les autres clones étant tronqués en 5'. Cependant l'ADNc A3B ne possède pas la séquence de 39 nt codant pour le "splice leader" retrouvée en 5' sur tous les ARNm de *Leishmania*.

Les ADNc des clones A3B et 2C1 présentent une homologie quasi totale et sont donc 20 considérés comme identiques, l'ADNc du clone 2C1 correspondant à une partie tronquée en 5' de l'ADNc du clone A3B.

Le clone A3B, représentatif de cette famille a fait l'objet d'un séquençage entier dans les deux sens.

On a rapporté sur la figure 2 les sites des enzymes de restrictions pour chacun de ces clones.

25 Les séquences SEQ ID N°1 à 5, correspondent respectivement à celles des ADNc de A3B, 2C1, 1A1, 2G1, W2.

- Analyse des différentes séquences protéiques déduites

La traduction des différentes séquences d'ADNc en séquences protéiques a été réalisée en choisissant le cadre de lecture correspondant à celui suggéré par la

position du codon d'initiation sur le plasmide pB-SK, dont la transcription est sous le contrôle du promoteur du gène *lacZ* soumise à l'induction par l'IPTG.

La protéine A3B présente les régions illustrées sur les figures 3A et 3B. En NH₂-terminal, on identifie un peptide hydrophobe, pouvant être clivé, qui est décrit dans

- 5 la littérature comme un peptide signal de la voie sécrétion. On rencontre ensuite le domaine répété riche en leucine, au nombre de 6 répétitions pour le clone A3B. A une dizaine d'acides aminés de la fin de ce domaine se trouve une région riche en proline, thréonine et sérine, appelée ci-après région poly P/T/S. Cette région est suivie d'une 10 région riche en cystéines, pouvant être impliquée dans des ponts disulfures. Enfin la séquence protéique se termine par un peptide signal hydrophobe.

Les ADNc des clones A3B et 2C1 présentent une homologie quasi totale et sont donc considérés comme identiques, l'ADNc du clone 2C1 correspondant à une partie tronquée en 5' de l'ADNc du clone A3B.

- 15 Le clone A3B, représentatif de cette famille, a fait l'objet d'un séquençage entier dans les deux sens.

On a rapporté sur la figure 2, les sites des enzymes de restriction pour chacun de ces clones Nt=nucléotides ; ATG=codon d'initiation ; TAG=codon stop.

- 19 L'analyse sur le banque de donnée PROSITE montre que la protéine A3B possède un site de N-glycosylation localisé à la fin de chaque domaine répété riche en leucine, et 20 12 sites potentiels de phosphorylations.

- L'analyse de la localisation de cette protéine sur le serveur PSORT prédit une localisation cytoplasmique à 92%, ce qui indique que la protéine est soluble. Cette protéine est vraisemblablement ancrée à la surface par un Glycosyl Phosphatidyl Inositol ou GPI. Le peptide signal hydrophobe peut donc être clivé et permettre 25 l'ancre du GPI au niveau de l'asparagine (D).

- Le poids moléculaire théorique de la protéine du clone A3B diffère d'environ 2,9 kDa avec celui des protéines 1A1 et W2, ce qui est en accord avec la différence de 2,5 kDa observée entre les protéines recombinantes correspondantes. Cette différence est due à la présence d'un nombre variable de répétitions riches en leucines ou LRR, chacune 30 présentant aussi une composition en acides aminés particulière.

Les poids moléculaires apparents et théoriques des quatre types de PSA de l'invention sont rassemblés dans le tableau III suivant.

Tableau III

5

| Type de PSA | P.M. de la protéine recombinante | P.M. théorique (non tronquée) | P.M. sans peptide signal (3,2 kDa) |
|-------------------|----------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| 4 LRR (2G1) | / | 33,5 kDa | 30,3 kDa |
| 6 LRR (A3B) | 42,5 kDa | 38,5 kDa | 35,3 kDa |
| 7 LRR (1A1 et W2) | 45 kDa | 41,4 kDa | 38,2 kDa |

2 - Obtention de parasites génétiquement modifiés :

Le clonage directionnel du gène LaPSA 38s dans le vecteur d'expression pTex a permis d'obtenir une construction capable d'exprimer le gène PSA en position sens.

10 Le plasmide pTex-LaPSA 38s orientation sens et le vecteur pTex vide ont ensuite été électroporés dans la souche sauvage *Leishmania infantum* Mon 1 Clone 1, puis les parasites ont été sélectionnés par la génétycine.

L'étude a été réalisée sur des parasites de l'espèce *L. infantum* sauvages (Sau), ceux transfectés par le pTex vide (pTex) et ceux transfectés par le pTex contenant la 15 séquence nucléotidique d'intérêt (Sens).

Caractérisation moléculaire :

L'analyse de l'ADN total par southern blot montre que la construction sens est stable et amplifiée chez la souche transformée. Les résultats sont illustrés sur la figure 4 qui donne les analyses des transcrits par RT-PCR chez les deux formes, promastigotes (P) 20 et amastigotes (A). La figure 5 donne le niveau de production de la protéine par western-blotting, à l'aide d'un anticorps anti-PSA (figure 5A : protéines constitutives ; figure 5B : protéines excrétées / sécrétées)

Caractérisation phénotypique des mutants :

La comparaison des cinétiques de croissance entre Ldi WT, Ldi pTex et Ldi Sens 25 montre que la surexpression de LaPSA 38s n'interfère pas avec la croissance des

parasites. Seule une phase de latence plus longue est observée pour les souches transformées par rapport à la souche sauvage.

La sensibilité à la lyse par le complément humain a également été étudiée.

Récemment, il a été démontré que la PSA de *L. amazoniensis* avait la propriété

5 d'inhiber l'action du complément *in vitro*. Les promastigotes "sens" sont plus sensibles au complément. L'excès de PSA à la surface des parasites peut ainsi entraîner un clivage ainsi qu'une formation de complexes plus importante engendrant une lyse accrue.

Etude de pouvoir infectieux des parasites.

10 Pour étudier l'effet de la surexpression de LaPSA 38s sur le pouvoir infectieux des parasites, la première approche a consisté à mettre en contact des promastigotes des souches transformées avec des macrophages de chien, qui est le réservoir domestique naturel de la *leishmaniose* viscérale.

Les figures 6A et 6B donnent les résultats obtenus, respectivement, 2 h après contact,

15 avec les promastigotes et 48 h après contact avec les amastigotes sur ces figures, l'index parasitaire correspond au % de macrophages infectés par la souche Sens x le nombre de parasites par macrophage / % de macrophages infectés par la souche témoin (pTex) x le nombre de parasites par macrophage.

Les promastigotes surexprimant LaPSA 38s, présentent un pouvoir infectieux 2 fois

20 plus important vis-à-vis des macrophages canins. De plus, après phagocytose, les amastigotes exprimant le transgène possèdent une capacité à survivre et à se multiplier dans la vacuole parasitophore significativement supérieure (2,5 à 5 fois) à celle du témoin transfété par le vecteur vide.

REVENDICATIONS

1. Constructions d'acides nucléiques, caractérisées en ce qu'elles comportent des acides nucléiques isolés en position sens, capables de coder pour une protéine immunogène de formes promastigotes ou de formes amastigotes de *Leishmania*, lesdits acides nucléiques répondant à l'une des séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5.
2. Constructions selon la revendication 1, caractérisées en ce que les séquences d'acides nucléiques sont des séquences de clones d'ADNC appartenant à une famille répondant aux caractéristiques illustrées par la figure 2 et comprenant en particulier un site de restriction *Sall* et deux sites de restriction *HindIII*, avec un codon stop situé en aval du premier site *HindIII*.
3. Constructions selon la revendication 2, caractérisées en ce que lesdites séquences d'acides nucléiques comportent un site de restriction *EcoRV* et/ou *PstI* entre les deux sites *Sall* et *HindIII*, ou de part et d'autre du site *Sall*.
4. Constructions selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que lesdites séquences d'acides nucléiques sont clonées en position sens dans un plasmide, tel que pTex.
5. Souches de *Leishmania* génétiquement modifiées, caractérisées en ce qu'elles correspondent à des formes amastigotes ou promastigotes de *Leishmania* transfectées par une construction selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.
6. Souches selon la revendication 5, caractérisées en ce qu'il s'agit de souches de *L.infantum*.
7. Procédé de transfection d'un parasite de *Leishmania*, caractérisé en ce qu'on introduit dans le parasite de *Leishmania* une construction selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, comportant un marqueur, on sélectionne les parasites transfectés grâce audit marqueur, on les met en culture dans un milieu axénique et asérique totalement défini et on récupère le surnageant de culture qui renferme les protéines immunogènes présentes dans des

REVENDICATIONS

1. Constructions d'acides nucléiques, caractérisées en ce qu'elles comportent des acides nucléiques isolés en position sens, capables de coder pour une protéine immunogène de formes promastigotes ou de formes amastigotes de *Leishmania*, lesdits acides nucléiques répondant à l'une des séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5.
2. Constructions selon la revendication 1, caractérisées en ce que les séquences d'acides nucléiques sont des séquences de clones d'ADNc comprenant en particulier un site de restriction *Sall* et deux sites de restriction *HindIII*, avec un codon stop situé en aval du premier site *HindIII*.
3. Constructions selon la revendication 2, caractérisées en ce que lesdites séquences d'acides nucléiques comportent un site de restriction *EcoRV* et/ou *PstI* entre les deux sites *Sall* et *HindIII*, ou de part et d'autre du site *Sall*.
4. Constructions selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que lesdites séquences d'acides nucléiques sont clonées en position sens dans un plasmide, tel que pTex.
5. Souches de *Leishmania* génétiquement modifiées, caractérisées en ce qu'elles correspondent à des formes amastigotes ou promastigotes de *Leishmania* transfectées par une construction selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.
6. Souches selon la revendication 5, caractérisées en ce qu'il s'agit de souches de *L.infantum*.
7. Procédé de transfection d'un parasite de *Leishmania*, caractérisé en ce qu'on introduit dans le parasite de *Leishmania* une construction selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, comportant un marqueur, on sélectionne les parasites transfectés grâce audit marqueur, on les met en culture dans un milieu axénique et asérique totalement défini et on récupère le surnageant de culture qui renferme les protéines immunogènes présentes dans des

concentrations de l'ordre de 10 à 20 fois supérieures à celle produite par la souche mère de *Leishmania*.

concentrations de l'ordre de 10 à 20 fois supérieures à celle produite par la souche mère de *Leishmania*.

| SEQ ID N°1 | A3B | | |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| | A3B | VHGGCGCAUTGGTGCAGTGCGCTGCTGGCTGGGGCCCCCTCGCGCGCUTGGTGGCGCTGCTGTGCACGAGCAGTGACCCGATGGCGGTGCTGGCG 114 | |
| SEQ ID N°2 | 2C1 | | CGTGGACGGGCAG 13 |
| SEQ ID N°3 | 1A1 | GGACGGACCACTTCATCGAGCGCACAGACGAAACGGCTAACGGTGTGGCGAGCGCGGTTGGCGATGGCGATGGCGAGATGGCGAG 10 | |
| | A3B | | |
| | W2 | | |
| SEQ ID N°4 | 2G1 | TGGCGCTGTCGATGGGGATGGGATTATAACGGCACGGAGATGGCGCTGGCGACGGCGAGATGGCGCTGGCG 56 | |
| | 2C1 | CGACTTCTGGCTGGAGGACATCATCTGGGACTTCCCCTGGCGCTGGGATGGGGATGGGATTACGGCACGGAGATGGCGCTGGCG 42 | |
| | 1A1 | GGACTTCTGGCTGGAGGACATCATCTGGGACTTCCCCTGGGCTGGCGCTGGGATGGGGATGGGATTACGGCACGGAGATGGCGCTGGCG 110 | |
| SEQ ID N°5 | A3B | CGACTTCTGGCTGGAGGACATCATCTGGGACTTCCCCTGGGCTGGCGCTGGGATGGGGATGGGATTACGGCACGGAGATGGCGCTGGCG 314 | |
| | W2 | CGACTTCTGGCTGGAGGACATCATCTGGGACTTCCCCTGGGCTGGCGCTGGGATGGGGATGGGATTACGGCACGGAGATGGCGCTGGCG 62 | |
| 2G1 | AGCGCTGACTACAGGAEGTICATGATGAACTTCCGGGAAATGGGGAGGGACTGAGGGGGACGGCTGGCGCCCGCTGGAGCTGG 149 | | |
| 2C1 | AGCGCTGACTACAGGAEGTICATGAACTTCCGGGAAATGGGGAGGGACTGAGGGGGACGGCTGGCGCCCGCTGGAGCTGG 213 | | |
| 1A1 | AGCGCTGACTACAGGAEGTICATGATGAACTTCCGGGAAATGGGGAGGGACTGAGGGGGACGGCTGGCGCCCGCTGGAGCTGG 210 | | |
| A3B | AGCGCTGACTACAGGAEGTICATGATGAACTTCCGGGAAATGGGGAGGGACTGAGGGGGACGGCTGGCGCCCGCTGGAGCTGG 414 | | |
| | W2 | AGCGCTGACTACAGGAEGTICATGATGAACTTCCGGGAAATGGGGAGGGACTGAGGGGGACGGCTGGCGCCCGCTGGAGCTGG 162 | |
| 2G1 | CCTTGATATCACTGTGATGAAAAGTCTGAGAAGGTCAACGGGACCGTGGCTGCCAGTGGAGCTGGCTGG 281 | | |
| 2C1 | CCTTGATATCACTGTGATGAAAAGTCTGAGAAGGTCAACGGGACCGTGGCTGCCAGTGGAGCTGGATGAAAGCAGCTGACCCCTTCGATGAAAGG 310 | | |
| 1A1 | CCTTGATATCACTGTGATGAAAAGTCTGAGAAGGTCAACGGGACCGTGGCTGCCAGTGGAGCTGGATGAAAGCAGCTGACCCCTTCGATGAAAGG 482 | | |
| A3B | CCTTGATATCACTGTGATGAAAAGTCTGAGAAGGTCAACGGGACCGTGGCTGCCAGTGGAGCTGGATGAAAGCAGCTGACCCCTTCGATGAAAGG 262 | | |
| | W2 | | |
| 2G1 | ATGACGCTGGCTGGACAACCTTAACCTGACAGCACGGCGCTGGCGACGGCTGGCG 341 | | |
| 2C1 | CACTAAGGTTGTCGGGACGGCTGCCGCCQAGTGGAGTGGGATGAGCTGGCTGGAGACCTTAACCTGACAGCACGGCGCTGGCGACGGCTGGCG 410 | | |
| 1A1 | ATGACGCTGGCTGGAGGACAACTTAACCTGACAGCACGGCGCTGGCGACGGCTGGCG 542 | | |
| A3B | CACTAAGGTTGTCGGGACGGCTGCCGCCAGTGGAGTGGGATGAGCTGGCTGGAGACCTTAACCTGACAGCACGGCGCTGGCGACGGCTGGCG 362 | | |
| | W2 | | |
| 2G1 | ATGAAAGCAGCTGATGAACTTCCGATCTGGGAGGGCACTAAAGGTGTCGGGACGGCTGGCGCCAGTGGGATGGGAGGGCGAG 337 | | |
| 2C1 | CACTGGAAGCTCGATGAGCAGCTGACCGTCTGGGATGGGAGGGCACTAAAGGTGTCGGGACGGCTGGGATGGGAGGGCGAG 441 | | |
| 1A1 | CACTGGAAGCTCGATGAGCAGCTGACCGTCTGGGATGGGAGGGCACTAAAGGTGTCGGGACGGCTGGGAGGGCGAG 510 | | |
| A3B | CACTGGAAGCTCGATGAGCAGCTGACCGTCTGGGATGGGAGGGCACTAAAGGTGTCGGGACGGCTGGGAGGGCGAG 642 | | |
| | W2 | CACTGGAAGCTCGATGAGCAGCTGACCGTCTGGGATGGGAGGGCACTAAAGGTGTCGGGACGGCTGGGAGGGCGAG 462 | |
| 2G1 | CCCTGCACTGAAAGTACTGCGATCTGFCGGGAGGTCTGCCCGCTGTGGATGAGGAGCTGAGCTGGCTGG 337 | | |
| 2C1 | CCCTGCACTGAGAGAACTGCGCTCTGCCGGAGTCTGCCCGCTCTGCGATGCCGAAAGCTGCGATCTGCTGACTGAGGCGAACACTTCG 541 | | |
| 1A1 | CCCTGCACTGAGACTGCGATCTGCCGGAGTCTGCCCGCTCTGCGATGCCGAAAGCTGCGATCTGCTGACTGAGGCGAACACTTCG 610 | | |
| A3B | CCCTGCACTGAGAGAACTGCGCTCTGCCGGAGTCTGCCCGCTCTGCGATGCCGAAAGCTGCGATCTGCTGACTGAGGCGAACACTTCG 742 | | |
| | W2 | CCCTGCACTGAGAGAACTGCGATCTGCCGGAGTCTGCCCGCTCTGCGATGCCGAAAGCTGCGATCTGCTGACTGAGGCGAACACTTCG 562 | |
| 2G1 | CGGGTGGCTGGCGCACTGGGGAGGGAGAAGGACCCCTCGATGACCAATGGGAATGGCACATGGGGAGGGACTGCAAGCTGGTAAAGGGCTGGCG 437 | | |
| 2C1 | CGGGTGGCTGGCGCACTGGGGAGGGAGAAGGACCCCTCGATGACCAATGGGAATGGCACATGGGGAGGGACTGCAAGCTGGTAAAGGGCTGGCG 641 | | |
| 1A1 | CGGGTGGCTGGCGCACTGGGGAGGGAGAAGGACCCCTCGATGACCAATGGGAATGGCACATGGGGAGGGACTGCAAGCTGGTAAAGGGCTGGCG 710 | | |
| A3B | CGGGTGGCTGGCGCACTGGGGAGGGAGAAGGACCCCTCGATGACCAATGGGAATGGCACATGGGGAGGGACTGCAAGCTGGTAAAGGGCTGGCG 842 | | |
| | W2 | CGGGTGGCTGGCGCACTGGGGAGGGAGAAGGACCCCTCGATGACCAATGGGAATGGCACATGGGGAGGGACTGCAAGCTGGTAAAGGGCTGGCG 662 | |
| 2G1 | CCGACTGCTGCTCCGGAACGACCAAGACTAACCGGCCACCACCGTGGCACCCCTGAGCTGGCTCTCTACTCTCTCCAGGGTGGGGTGGAGGTGG 537 | | |
| 2C1 | CCGACTGCTGCTCCGGAACGACCAAGACTAACCGGCCACCACCGTGGCACCCCTGAGCTGGCTCTCTACTCTCTCCAGGGTGGGGTGGAGGTGG 741 | | |
| 1A1 | CCGACTGCTGCTCCGGAACGACCAAGACTAACCGGCCACCACCGTGGCACCCCTGAGCTGGCTCTCTACTCTCTCCAGGGTGGGGTGGAGGTGG 810 | | |
| A3B | CCGACTGCTGCTCCGGAACGACCAAGACTAACCGGCCACCACCGTGGCACCCCTGAGCTGGCTCTCTACTCTCTCCAGGGTGGGGTGGAGGTGG 942 | | |
| | W2 | CCGACTGCTGCTCCGGAACGACCAAGACTAACCGGCCACCACCGTGGCACCCCTGAGCTGGCTCTCTACTCTCTCCAGGGTGGGGTGGAGGTGG 762 | |
| 2G1 | ATGGGTGAGGTGTGGAGGGGGACTCCGCTGGGGTGGCTGGCTGGCTGGAGGGTACCTCTCTGAGGGTACCTCTCTGAGGGTACCTCTCTGAGGGTGG 637 | | |
| 2C1 | ATGGGTGAGGTGTGGAGGGGGACTCCGCTGGGGTGGCTGGCTGGAGGGTACCTCTCTGAGGGTACCTCTCTGAGGGTACCTCTCTGAGGGTGG 841 | | |
| 1A1 | ATGGGTGAGGTGTGGAGGGGGACTCCGCTGGGGTGGCTGGCTGGAGGGTACCTCTCTGAGGGTACCTCTCTGAGGGTACCTCTCTGAGGGTGG 910 | | |
| A3B | ATGGGTGAGGTGTGGAGGGGGACTCCGCTGGGGTGGCTGGCTGGAGGGTACCTCTCTGAGGGTACCTCTCTGAGGGTACCTCTCTGAGGGTGG 1042 | | |
| | W2 | ATGGGTGAGGTGTGGAGGGGGACTCCGCTGGGGTGGCTGGCTGGAGGGTACCTCTCTGAGGGTACCTCTCTGAGGGTACCTCTCTGAGGGTGG 862 | |
| 2G1 | TGGCGGGCTGGCGCGCTCAAGCGAGGGGGTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG 737 | | |
| 2C1 | TGGCGGGCTGGCGCGCTCAAGCGAGGGGGTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG 941 | | |
| 1A1 | TGGCGGGCTGGCGCGCTCAAGCGAGGGGGTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG 1010 | | |
| A3B | TGGCGGGCTGGCGCGCTCAAGCGAGGGGGTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG 1142 | | |
| | W2 | TGGCGGGCTGGCGCGCTCAAGCGAGGGGGTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG 962 | |
| 2G1 | CCCTCTCTCTGAGGTGGCTGCCCTGGCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGG 837 | | |
| 2C1 | CCCTCTCTCTGAGGTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGG 1041 | | |
| 1A1 | CCCTCTCTCTGAGGTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGG 1108 | | |
| A3B | CCCTCTCTCTGAGGTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGG 1342 | | |
| | W2 | CCCTCTCTCTGAGGTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGGCTGCCCTGG 1061 | |
| 2G1 | CAACACGGCACCGGACACGGCACCGACTAACCGGCCACCACCGTGGCACCCCTGAGCTGGCTGCCCTCTCTACTCTCTCCAGGGTGGGGTGGAGGTGG 937 | | |
| 2C1 | CAACACGGCACCGGACACGGCACCGACTAACCGGCCACCACCGTGGCACCCCTGAGCTGGCTGCCCTCTCTACTCTCTCCAGGGTGGGGTGGAGGTGG 1081 | | |
| 1A1 | CAACACGGCACCGGACACGGCACCGACTAACCGGCCACCACCGTGGCACCCCTGAGCTGGCTGCCCTCTCTACTCTCTCCAGGGTGGGGTGGAGGTGG 1208 | | |
| A3B | CAACACGGCACCGGACACGGCACCGACTAACCGGCCACCACCGTGGCACCCCTGAGCTGGCTGCCCTCTCTACTCTCTCCAGGGTGGGGTGGAGGTGG 1342 | | |
| | W2 | CAACACGGCACCGGACACGGCACCGACTAACCGGCCACCACCGTGGCACCCCTGAGCTGGCTGCCCTCTCTACTCTCTCCAGGGTGGGGTGGAGGTGG 1161 | |
| 2G1 | GGCTGGCGAGCTCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG 1037 | | |
| 2C1 | GGCTGGCGAGCTCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG 1208 | | |
| 1A1 | GGCTGGCGAGCTCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG 1308 | | |
| A3B | GGCTGGCGAGCTCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG 1442 | | |
| | W2 | GGCTGGCGAGCTCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG 1209 | |
| 2G1 | CTGGCGGGCGGCCCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG 1109 | | |
| 2C1 | CTGGCGGGCGGCCCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG 1371 | | |
| 1A1 | CTGGCGGGCGGCCCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG 1439 | | |
| A3B | CTGGCGGGCGGCCCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG 1439 | | |
| | W2 | CTGGCGGGCGGCCCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG 1233 | |

BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

FIGURE 1

Alignement des différentes séquences ADNc obtenues

SEQ ID N°1 A3B

SEQ ID N°2 2C1

SEQ ID N°3 1A1

SEQ ID N°4 2G1

A3B GTGCACTAAGGACATGTATATATGTATGTATATATATGAGTATATATATGACGGTATATATAGGAATTGGT
 2C1 GTGCACTTAAGGACATGTATATATGTATGTATGTATATGAGTATATATATGACGGTATATATAGGAATTGGT
 1A1 GTCATGTAAGGACATGTATATATGTATGTATGTAGGTATATGAGTATGTATATGACGGTATATATAGGAATTGGT
 2G1 GTGCACTTAAGGACATGTATATATGTATGTATGTAGGTATATGAGTATGTATATGACGGTATATATAGGAATTGGT
 W2 GTGCACTAAGGACATGTATATATGTATGTAGGTATATGAGTATGTACGGTATATATAGGAATTGGT

A3B ATGGTGAGGTATGCCATGTGCCATGCCATATATAGCTGTGCCAGCGCTGGCCACGCCTGGCTGCCCCCTCG
 2C1 ATGGTGAGGTATGCCATGTGCCATGCCATATATAGCTGTGCCAGCGCTGGCCACGCCTGGCTGCCCCCTCG
 1A1 ATGGTGAGGTATGCCATGTGCCATATATAGCTGTGCCAGCGCTGGCCACGCCTGGCTGCCCCCTCG
 2G1 ATGGTGAGGTATGCCATGTGCCATATATAGCTGTGCCAGCGCTGGCCACGCCTGGCTGCCCCCTCG
 W2 ATGGTGAGGTATGCCATGTGCCATATATAGCTGTGCCAGCGCTGGCCACGCCTGGCTGCCCCCTCG

A3B CCTGCGGGTGTCACTCGCTGTGGCGCGCTGGCGGTGGCGGTGGCGGTGGCGGTGGCGGGGGCTCCCTGTG
 2C1 GCTGTGGGTGTCCCTCCCTGTGGCGCGCTGGCGGTGGCGGTGGCGGTGGCGGGGGCTCCCTGTG
 1A1 GCTGTGGGTGTCACTCCCTGTGGCGCGCTGGCGGTGGCGGTGGCGGGGGCTCCCTGTG
 2G1 GCTGTGGGTGTCACTCCCTGTGGCGCGCTGGCGGTGGCGGTGGCGGGGGCTCCCTGTG
 W2 GCTGTGGGTGTCACTCCCTGTGGCGCGCTGGCGGTGGCGGTGGCGGGGGCTCCCTGTG

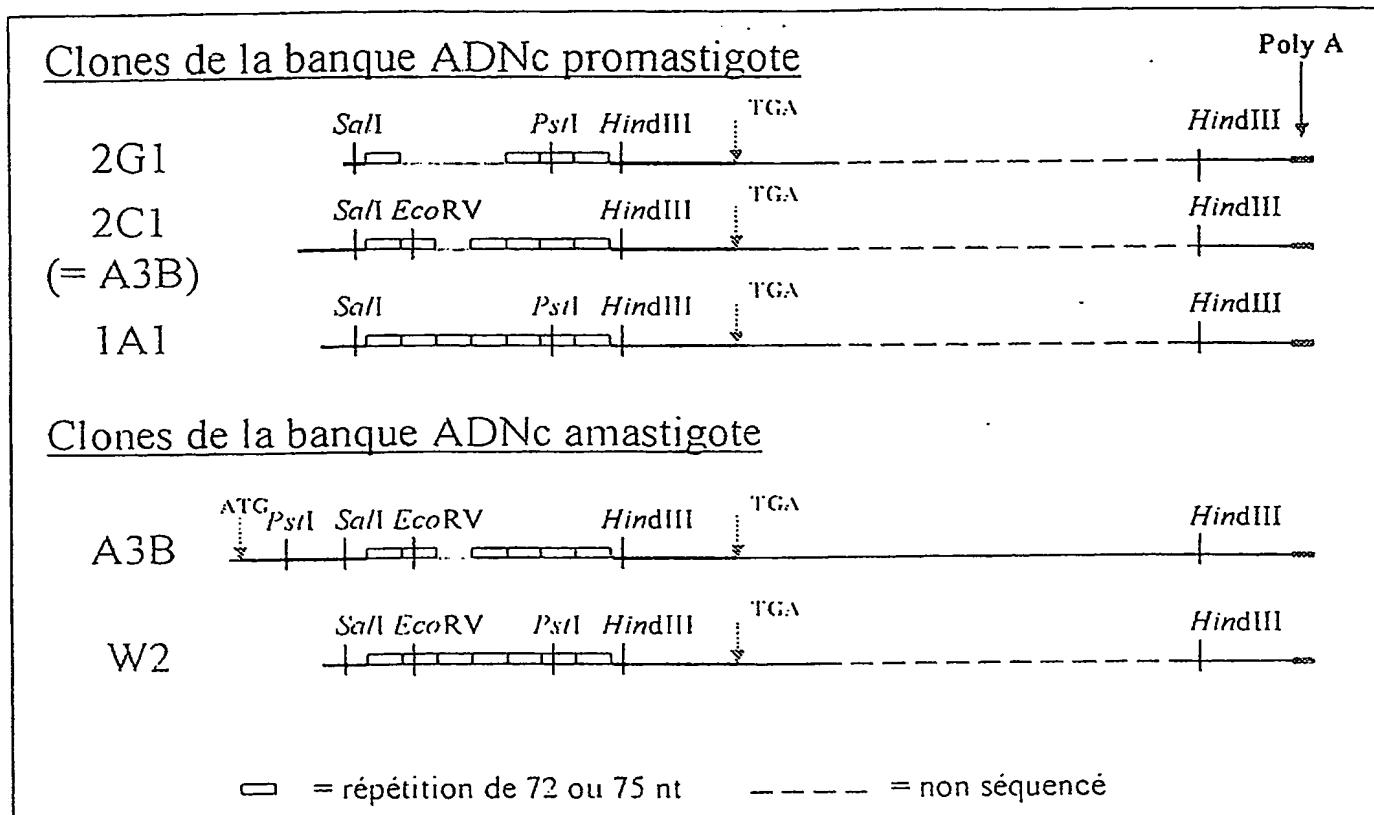
TTTCTCTATTTCTCTGTCCTGTGACCTCAAAA
 TTTCTCTATTTCTCTGTCCTGTGACCTCAAAA
 TTTCTCTATTTCTCTGTCCTGTGACCTCAAAA
 TTTCTCTATTTCTCTGTCCTGTGACCTCAAAA
 TTTCTCTATTTCTCTGTCCTGTGACCTCAAAA

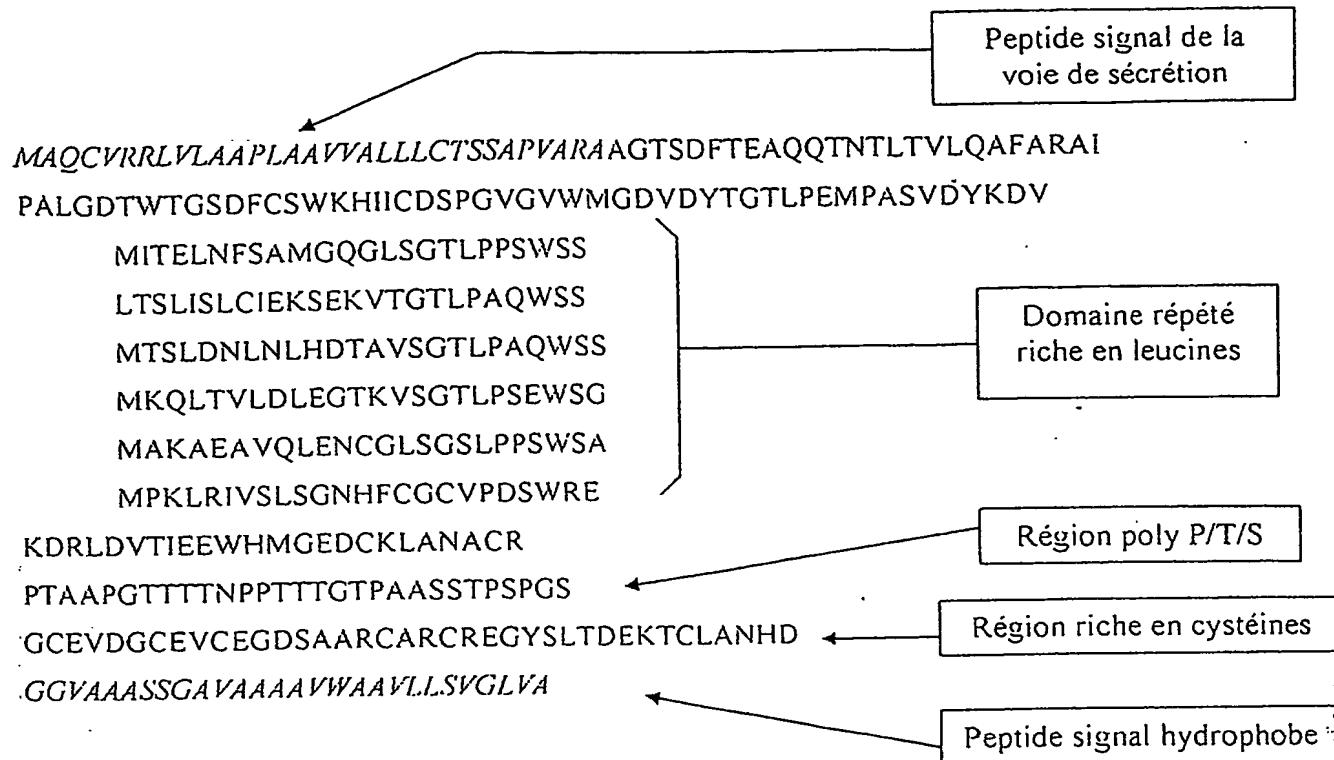
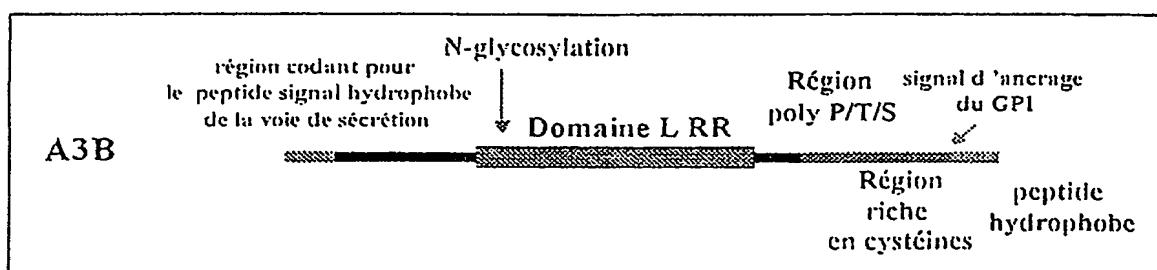
FIGURE 1 (Suite)

Alignement en 3' des séquences nucléotidiques des différents clones ADNc

SEQ ID N°1 A3B
 SEQ ID N°2 2C1
 SEQ ID N°3 1A1
 SEQ ID N°4 2G1
 SEQ ID N°5 W2

BEST AVAILABLE COPY

FIGURE 2

FIGURE 3AFIGURE 3B

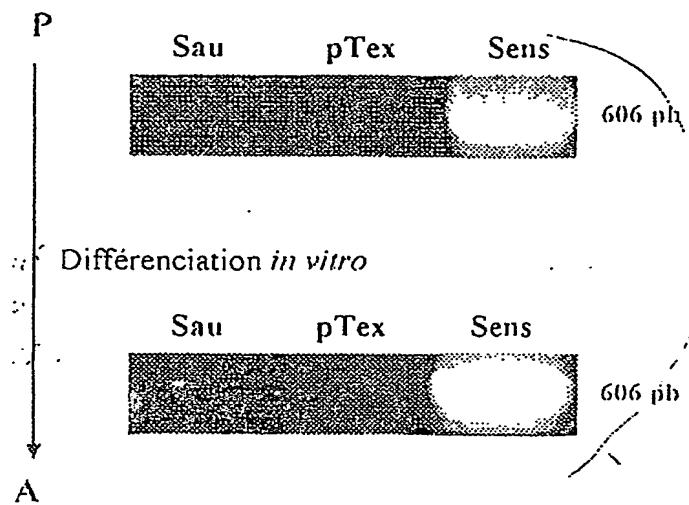
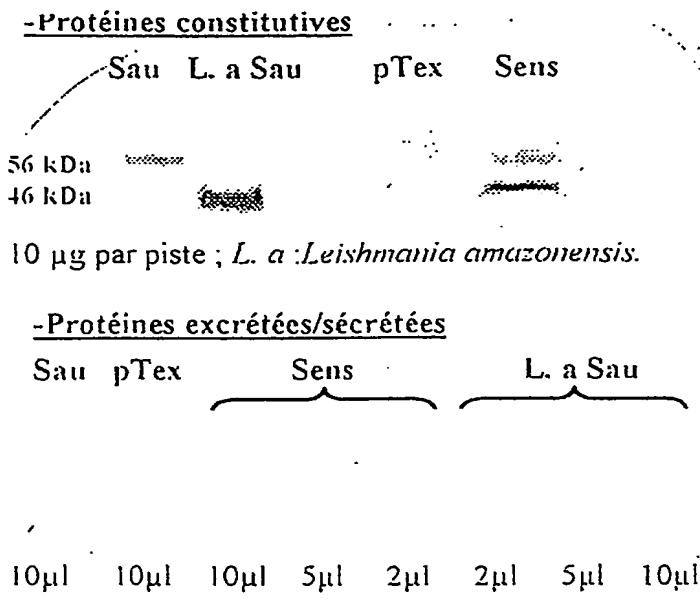


FIGURE 4

BEST AVAILABLE COPY

**FIGURE 5**

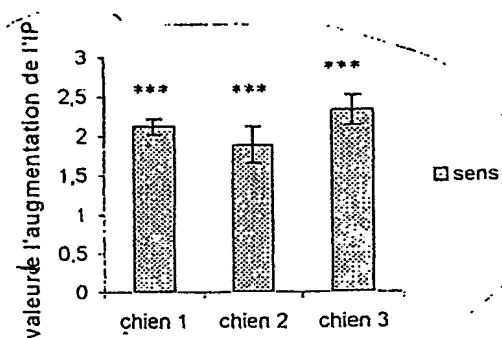


FIGURE 6A

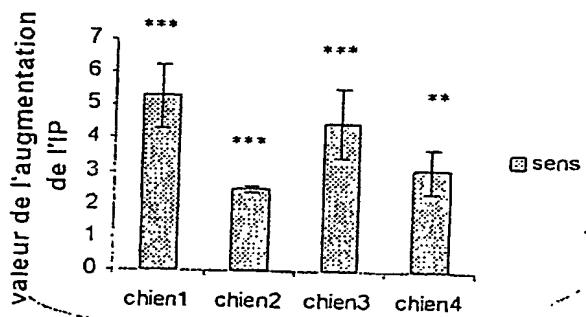


FIGURE 6B

SEQUENCE LISTING

<110> INSTITUT DE LA RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (IRD)
<120> NOUVEAUX MOYENS POUR LA PREVENTION DES LEISHMANIOSES
<130> CP/BB 61158-1820
<140> FR 03 13 555
<141> 2003-12-19
<160> 5
<170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 2526
<212> DNA
<213> Leishmania amazonensis
<400> 1
gaccgcgttt gcgaatggcg cagtgcgtgc gtcggctggc gctggcggcg cccctcgccc
60
ctgtggtggc gctgctgctg tgcacgagca gtgcacccggc ggccgcgtgct gcggggacga
120
gcgacttcac tgaggcgcag cagacgaaca cgctgacggc gctgcaggcg tttgcgcgtg
180
cgatccctgc gcttggggac acgtggacgg gcagcgactt ctgctcggtt aagcacatca
240
tctgcgactc ccccgccgtc ggcgtgtggc tggcgatgt ggattataacc ggcacgcgtc
300
cgaggatgcc tgcgagcgtc gactacaagg acgtcatgtat cacgaaactg aacttcagcg
360
caatggcca gggctgagc gggacgctgc ccccctcatg gagctcgctg acgtccttga
420
tatcactgtg catcgaaaag tctgagaagg tcacccgcac gctgcctgcc cagtgagct
480
cgatgacgtc gctggacaac cttaacctgc acgacacggc ggtctccggc acgctgcctg
540
cccagtggag ctgcgttgc cagctgaccc ttctggatct ggagggcact aaggtgtccg
600
gcacgctgcc gtccgagtgg agtggatgg cgaaggccga ggccgtgcag ctggagaact
660
gcggctgtc cgggagtctg ccccccgtt ggtctgcgtat gccgaagctg cgtatcgct
720
cactgagcgg caaccacttc tgcgggtgcg tgcccgactc gtggagggag aaggaccgc
780
tcgtatgtac catcgaggaa tggcacatgg gcgaggactg caagcttgct aacgcctgcc
840
gccccactgc tgctccggaa acgaccacga ctaacccgcc caccaccacc ggcaccccaag

900

cagcctcctc tactccttct ccagggtcgg ggtgcgaggt ggatgggtgt gaggtgtgcg
960

agggggactc cgctgcgcgg tgcgccaggt gccgtgaggg ctactccctg acggacgaga
1020

agacgtgcct ggcgaaccac gatggcggcg tggcggcggc gtcgagcgg a cgggtggctg
1080

ccgcgtctgt gtggcggct gtgctgttga gcgtggggct ggtggcgtga gggtgccggc
1140

ggcacacgcg cacgcgcaca cgcgcgtcg catcgctgt gctttccgccc gttgtggcgc
1200

ctgcacggat gcacggcat gcggaggcgt gcatgcgtgt ggcgcgtgcca gctcttgtt
1260

gtctctccgt gtggccagca gtcggcaccc gcccgcatacg aatgtgcgcg cggcggcggt
1320

gtgtcgccct ggacagcgg a tgcgggcgc cgcgcgtcg cgtgtgccct gcggtctgct
1380

gtgctgcgcg cgcgcgcgta cggatgcg ctgtccggcc ctcttcgacg gggctcgctt
1440

gcgggtctgt gctctcggtg tctgtgccgg tgctgcctg gcgggggtgag agctggcggt
1500

ggcgtgggtg cgcgcgcggc agctctccgc tgcgttgagg gcccgcgtcc cctgcgtccg
1560

cgaccgcg cgcgcgcgc gacgcactg cgcgcgttg ttggcttgct ttgtctgtc
1620

gtgcgcactc tctttatattt tccgtttcat tcgcctgtat tctttctcc caccgcactg
1680

cggcctcgtc accgcggccg tgcggtgccg aggccgggtga tgtgcgcgtt tgccccccct
1740

tcatggcgc gctggccga tcgccttgcgc tcccccctcc tccccctccc cctccgcgg
1800

gtcctgtcaa ttgttatatcc gtggacctta tcttcgtact gcctccgcgc ctcttcgtta
1860

aagcttcgtt ggcgtgtgcc gccccccggc cgtcagcgc gctgtgtcg catgctcact
1920

gtgcgtcccc gtgcgtggc gtgcacgtaa ggacatgtat atatgtatgt gtatgtatat
1980

gagttatgtat atatgtacgg ttatatacg gaatttgcgtt atgttgagggt gtatgtatgt
2040

gcgtgcgtat attagtgtgt ggcgcgcgc gtcgtgcgc acgtctgtctt gcccgcctcc
2100

gctgtgcgtg tcactcgctg tggcggcggt ggcgggtggc gcccgggtt ggccgtgcgg
2160

ccccccgggggg ctcctctgtg tttctctatt tctctgttcc ctgttgaccc caaaaaaaaa
2220

tatatatgtatcggttatata taggaatttg tgtatgttgc ggtgtatgca tgtgcgtgc
2340

tatattatgtg tggcgagca cgccgtttgc gccacgctct gctgccccgc tccgctgtgc
2400

gtgtcaactcg ctgtggcgc ggtggcggt ggccgcgggt ggtggccgtg cggcggggcgg
2460

gggctcctct gtgtttctct atttctctgt tccctgttga cctcaaaaaaa aaaaaaaaaa
2520

aaaaaaaa
2526

<210> 2
<211> 1401
<212> DNA
<213> *Leishmania amazonensis*

<400> 2
cgtggacggg cagcgacttc tgctcggtga agcacatcat ctgcgactcc cccggcgctcg
60

gcgtgtggat gggcgatgtg gattataccg gcacgctgcc ggagatgcct gcgagcgtcg
120

actacaagga cgtcatgatc acggaactga acttcagcgc aatggccag gggctgagcg
180

ggacgctgcc cccctcatgg agctcgctga cgtccttgat atcactgtgc atcgaaaagt
240

ctgagaaggt caccggcacg ctgcctgccc agtggagctc gatgacgtcg ctggacaacc
300

ttaacctgca cgacacggcg gtctccggca cgctgcctgc ccagtggagc tcgatgaagc
360

agctgaccgt tctggatctg gagggcacta aggtgtccgg cacgctgccg tccgagtgga
420

gtggatggc gaaggccgag gccgtgcagc tggagaactg cggtctgtcc gggagtcgtc
480

ccccctcgta gtctgcgatg ccgaagctgc gtatcgcttc actgagcggc aaccacttct
540

gcgggtgcgt gcccgactcg tggagggaga aggaccgcct cgatgtgacc atcgaggaat
600

ggcacatggg cgaggactgc aagcttgcta acgcctgccg cccgactgtc gctccggaa
660

cgaccacgac taacccggcc accaccacccg gcaccccccagc agcttcctct actccttctc
720

cagggtcggg gtgcgaggtg gatgggtgtg aggtgtgcga gggggactcc gctgcgcggt
 780

gcccgcaggta ccgtgagggc tactccctga cggacgagaa gacgtgcgtg gcgaaccacg
 840

atggcggcgt ggccgcggcg tcgagcggag cggtggctgc cgctgctgtg tggcggctg
 900

tgctgttagt cgtggggctg gtggcgttagt ggtgcggcgg gccccttc tctgtggtgc
 960

ccctggtgcc tgccctcgcc cccggcacgg cgtcgtcgt gccccttc acccccacca
 1020

gccgacgggg agaccgacag ccacacgcgc acgacacac gccgtcgtgc atcgctgtg
 1080

cgtcactta aggacatgtat tatatgtatg tgtatgtata tgagtatgtat tatatgtccg
 1140

gttatata ggaatttgtat tatgttgagg tgtatgtatg tgcgtgcgtat tattatgtctg
 1200

tgcgagcacg cgtgtgcgc cacgcttc tgccgcctc cgctgtgcgt gtccctccct
 1260

gtggcgcgc tgccgggtgg ccccggtgg tgccgtgcg gcggcgggg gtcctctgt
 1320

gtttctctat ttctctgttc cctgttgcacc caaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaa
 1380

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a
 1401

<210> 3
 <211> 1684
 <212> DNA
 <213> Leishmania amazonensis

<400> 3
 ggacgggcag cgacttctgc tcgttggaaac acatcatctg cgactcccc ggcgtcggcg
 60

tgtggatggg cgatgtggat tataccggca cgctgccga gatgcctgcg agcgtcgact
 120

acaaggacgt catgatcatg gcactggact tcggcgcaat gggccaggaa ctgagcggga
 180

cgctcccccc ctcatggagc tcgctgacgt cttgtatgtc actgtggatc gaaaagtctg
 240

agaaggcacg cggcacgctg octaccagt ggagctcgat gaagcagctg acccttctgc
 300

atctgaaggc cactaaggta tccggcacgc tgccggccga gtggatggg atgacgtcgc
 360

tggacgaccc taacctgcac gacacggcg tctccggcac gctgcctgcc cagtggagct
 420

ccatgaagca gctgatcgat ctggatctgg agggactaa ggtgtccggc acgctgccgc
 480
 ccgagtggag tgggatggcg aaggccgagg ccctgcagct gaagtactgc gatctgtccg
 540
 ggagtctgcc cccctcggtt tcttcgatgc agaagctgcg tatcgctca ctgagcggca
 600
 accacttctg cgggtgcgtg cccgactcgt ggagggagaa ggaccgcctc gatgtgacca
 660
 tcgaggaatg gcacatgggc gaggactgca agcttgctaa cgcctgccgc ccgactgctg
 720
 ctccggaaac gaccacgact aacccgccc ccaccaccgg cacccagca gcctcctcta
 780
 ctccttctcc agggtcgggg tgcgaggtgg atgggtgtga ggtgtgcgag ggggactccg
 840
 ctgcgcggtg cgccagggtgc cgtgagggtct actccctgac ggacgagaag acgtgcctgg
 900
 cgaaccacga tggcggcggt gcggcggcgt cgagcggagc ggtggctgcg gctgctgtgt
 960
 gggcggctgt gctgttgagc gtggggctgg tggcgtgagg gtgcggcgcc cccctttct
 1020
 ctgtggtgcc cctggtgccct gccctcgccc ccagcacggc gtcgtcgctg ccctctcacc
 1080
 cccaccagcc gaaggggaga ccgacagcca cacgcacacg cgcacgcgcc gtcgtgcata
 1140
 gcgtgtgctt tccgccgtt tggcgctgc gggatgcac gggatgcgg aggctgtcat
 1200
 gcgtgtgcgc gtgcagctc ttgtgtgtct ctccgtgtgg ccagcagtcg gcacccgcgc
 1260
 ccatcgatg tgcgcgcggc ggcggtgtgt cgcctggac agcggatgcg ggcgcgcgc
 1320
 ctcgcgtgt gcccgtcggt ctgctgtgtct gcccgcgcgag cgacgtacgg agtgcata
 1380
 aggacatgta tataatgtatg tgttaggtata ttagtatgtatata tataatgtacg gtttatata
 1440
 ggaatttggc tatgttgagg tgtatgcatt tgcgtgcgtt tattagtctg tgcgagcact
 1500
 cgtgttgccg caccgtttgc tgccccgcctc tgctgtgcgt gtcactccct gtgggcgcgc
 1560
 tggcgggtgg cgccgggtgg tggccgtgcg ggggggggg gtcctctgt gtttctctat
 1620
 ttctctgttc cctgttgacc tcáagaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa
 1680

aaaa
1684

<210> 4
<211> 1404
<212> DNA
<213> Leishmania amazonensis

<400> 4

tcggcgtgtg gatgggcgat gtggattata cccgcacgct gccggagatg cctgcgagcg
60

tcgactacaa ggacgtcatg atcacggaac tgaacttcgg cgcaatgggc cagggactga
120

gcgggacgct gccccctca tggagctcga tgaaggcagct gatcgatctg gatctggagg
180

gcactaagg tgcggcacc ctggccccc agtggagtgg gatggcgaag gccgaggccc
240

tgcagctgaa gtactgcgat ctgtccgggta gtctgccccctcgtggtct tcgatgcaga
300

agctgcgtat cgtctcactg agcggcaacc acttctgcgg gtgcgtgccc gactcgtgga
360

gggagaagga ccgcctcgat gtgaccatcg aggaatggca catgggcgag gactgcaagc
420

ttgctaacgc ctgcccggc actgctgctc cggAACGAC cacgactaac ccgccccacca
480

ccaccggcac cccagcagcc tcctctactc cttctccagg gtcgggtgc gaggtggatg
540

ggtgtgaggt gtgcgagggg gactccgctg cgcggcgc caggtgccgt gagggtact
600

ccctgacgga cgagaagacg tgccctggcga accacgatgg cggcgtggcg gggcgtcaa
660

gcggagcgg ggcgtggct gctgtgtgg cggctgtct gttgagcgtg gggctggtgg
720

cgtgagggtg cggcgcccc ctcttctctg tggtgccccct ggtgcctgccc ctcgcccccc
780

gcacggcgtc gtcgctgccc tctctcaccc ccaccagccg acggggagac cgacagccac
840

acgcgcacgc gcacacgccc tcgtgcattcg cgtgtgttt ccgcgttgtt ggcgcctgca
900

cggatgcacg ggcgtgcgga ggcgtgcattcg cgtgtgcgc tgccagctct tgtgtgtctc
960

tccgtgtggc cagcagtccgg caccgcgc gatgaatgt ggcgcggcg ggggtgtgtc
1020

gccttggaca gcggatgctg gcgcggcccc ctgcgtgtg ctcggctctg cgtgtcgtgg
1080

ccgcgcgagc gacgtacgga gtgcgtgtg tgcacttaag gacatgtata tatgtatgtg
1140

tatgtatatg agtatgtata tatgtacggt tatatatagg aatttgtgt a ttttgagggt
1200

tatgcgtatg cgtgcgtata ttatgtgtg cgagcacgac tggtgcgcc a cgtttgctg
1260

ccccctccg ctgtgggtgt cactcgctgt gggcccggtg gcgggtggcc ccgggtgggt
1320

cccgttcggc gggcgggggc tcctctgtgt ttctctattt ctctgttccc ttttgcctc
1380

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa
1404

<210> 5

<211> 1501

<212> DNA

<213> Leishmania amazonensis

<400> 5

ccggcgtcgg cgtgtggatg ggcgtatgtgg attataccgg cacgtgcgg gagatgcctg
60

cgagcgtcga ctacaaggac gtcatgatca cgaaactgaa cttcagcgca atgggccagg
120

ggctgagcgg gacgctgccc ccctcatgga gctcgctgac gtccttgata tcactgtgca
180

tgcggaaatc tgagaaggc accggcacgc tgcctgccc gtggagctcg atgacgtcgc
240

tggacaacct taacctgac gacacggcgg tctccggcac gctgccggcc gagtggagtg
300

ggatgacgac gctggacgac cttaacctgc acgacacggc ggtctccggc acgctgcctg
360

cccagtggag ctcgatgaag cagctgatcg atctggatct ggagggact aagggtgtccg
420

gcacgctgcc gcccggatgg agtggatgg cgaaggccga ggccctgcag ctgaagtact
480

gcgatctgtc cgggagtctg cccccctcg ggtcttcgat gcagaagctg cgtatcgct
540

cactgagcgg caaccacttc tgcgggtcg tgcccgactc gtggagggag aaggaccggc
600

tcgatgtgac catcgaggaa tggcacatgg gcgaggactg caagcttgct aacgcctgac
660

gccccactgc tgctccggga acgaccacga ctaacccgcc caccaccacc ggcacccca
720

cagcctcctc tactccttct ccagggtcgg ggtgcgaggt ggatgggtgt gaggtgtcgg
780

agggggactc cgctgcgcgg tgcgccagg gccgtgaggg ctactccctg acggacgaga
840
agacgtgcct ggcaaccac gatggcggcg tggcggcggc gtcaagcga gcggtggtcg
900
cggtgtgtgt gtggcggct gtgtgttga gcgtggggct ggtggcgtga gggtgccgccc
960
gccccctott ctctgtggtg cccctggtgc ctgccttcgc ccccagcacg gggtcgtcgc
1020
tgccctctca cccccaccag ccgaaggga gaccgacagc cacacgcaca cgccacgc
1080
ccgtcgtgca tcgcgtgtgc ttccgcgt tggtgcgcct gcgcggatgc acgggcatgc
1140
ggaggcgtgc atgcgtgtgc gcgtgccaac ttttgtgtgt ctctccgtgt ggccagcagt
1200
cgccacccgt gcacgtaagg acatgtataat atgtatgtgt aggtatataa gtatgtataat
1260
atgtacggtt atatatagga atttgttat gttgaggtgt atgcattgtgc gtgcgtataat
1320
tagtctgtgc gagcacgcgt gttgcgccac gctctgtgc ccgcctctgc tgtgcgtgtc
1380
actcgctgtg ggcgcgctgg cgggtggcgc cgggtggtgg ccgtcggcgc ggcggggct
1440
cctctgtgtt tctctatttc tctgttccct gttgacctca agaaaaaaaaaaaaaaa
1500
a
1501

BREVET D'INVENTION



N° 11235*03

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../2...



(À fournir dans le cas où les demandeurs et
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 @ W / 270601

| | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|-----------|---------|-----------|---------|-----|-------------------------------------|--|----------------------|----------------------|----------------------------------------------|--|-----|
| Vos références pour ce dossier (<i>facultatif</i>) | CP 61158-1820 | | | | | | | | | | | | | |
| N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL | 0313 555 | | | | | | | | | | | | | |
| TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) | | | | | | | | | | | | | | |
| "NOUVEAUX MOYENS POUR LA PREVENTION DES LEISHMANIOSES" | | | | | | | | | | | | | | |
| LE(S) DEMANDEUR(S) : | | | | | | | | | | | | | | |
| INSTITUT DE LA RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (IRD) | | | | | | | | | | | | | | |
| DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <tr> <td>1 Nom</td> <td>LEMESRE</td> </tr> <tr> <td>Prénoms</td> <td>Jean-Loup</td> </tr> <tr> <td>Adresse</td> <td>Rue</td> <td>138, Avenue de Lodève Bât. 6, 1D</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Code postal et ville</td> <td>13 40 70 MONTPELLIER</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (<i>facultatif</i>)</td> <td>IRD</td> </tr> </table> | | 1 Nom | LEMESRE | Prénoms | Jean-Loup | Adresse | Rue | 138, Avenue de Lodève Bât. 6, 1D | | Code postal et ville | 13 40 70 MONTPELLIER | Société d'appartenance (<i>facultatif</i>) | | IRD |
| 1 Nom | LEMESRE | | | | | | | | | | | | | |
| Prénoms | Jean-Loup | | | | | | | | | | | | | |
| Adresse | Rue | 138, Avenue de Lodève Bât. 6, 1D | | | | | | | | | | | | |
| | Code postal et ville | 13 40 70 MONTPELLIER | | | | | | | | | | | | |
| Société d'appartenance (<i>facultatif</i>) | | IRD | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <tr> <td>2 Nom</td> <td>CAVALEYRA</td> </tr> <tr> <td>Prénoms</td> <td>Mireille</td> </tr> <tr> <td>Adresse</td> <td>Rue</td> <td>53, Rue Copernic</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Code postal et ville</td> <td>13 40 00 MONTPELLIER</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (<i>facultatif</i>)</td> <td>IRD</td> </tr> </table> | | 2 Nom | CAVALEYRA | Prénoms | Mireille | Adresse | Rue | 53, Rue Copernic | | Code postal et ville | 13 40 00 MONTPELLIER | Société d'appartenance (<i>facultatif</i>) | | IRD |
| 2 Nom | CAVALEYRA | | | | | | | | | | | | | |
| Prénoms | Mireille | | | | | | | | | | | | | |
| Adresse | Rue | 53, Rue Copernic | | | | | | | | | | | | |
| | Code postal et ville | 13 40 00 MONTPELLIER | | | | | | | | | | | | |
| Société d'appartenance (<i>facultatif</i>) | | IRD | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <tr> <td>3 Nom</td> <td>SERENO</td> </tr> <tr> <td>Prénoms</td> <td>Denis</td> </tr> <tr> <td>Adresse</td> <td>Rue</td> <td>12, Avenue de Sète</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Code postal et ville</td> <td>13 45 60 POUSSAN</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (<i>facultatif</i>)</td> <td>IRD</td> </tr> </table> | | 3 Nom | SERENO | Prénoms | Denis | Adresse | Rue | 12, Avenue de Sète | | Code postal et ville | 13 45 60 POUSSAN | Société d'appartenance (<i>facultatif</i>) | | IRD |
| 3 Nom | SERENO | | | | | | | | | | | | | |
| Prénoms | Denis | | | | | | | | | | | | | |
| Adresse | Rue | 12, Avenue de Sète | | | | | | | | | | | | |
| | Code postal et ville | 13 45 60 POUSSAN | | | | | | | | | | | | |
| Société d'appartenance (<i>facultatif</i>) | | IRD | | | | | | | | | | | | |
| S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages. | | | | | | | | | | | | | | |
| DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE <i>(Nom et qualité du signataire)</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| Mandataire : Chantal PEAUCELLE 92-1189 Paris, le 19 novembre 2003 | | | | | | | | | | | | | | |

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2... / 2...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

INV

DB 113 © W / 270601

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-----------------------------------------|------------|---------|--|----------|--|---------|-----|-----------|----------------------|--|---------------------|--|----------------------------------------------|--|-----|--|
| Vos références pour ce dossier (<i>facultatif</i>) | CP 61158-1820 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL | 03 13 555 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| "NOUVEAUX MOYENS POUR LA PREVENTION DES LEISHMANIOSES" | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| LE(S) DEMANDEUR(S) : | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| INSTITUT DE LA RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (IRD) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Nom</td> <td>HOLZMULLER</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Philippe</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> </tr> <tr> <td>Grand Rue</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Code postal et ville</td> </tr> <tr> <td colspan="2">[3,4,5,6,0] POUSSAN</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (<i>facultatif</i>)</td> </tr> <tr> <td colspan="2">IRD</td> </tr> </table> | | <input checked="" type="checkbox"/> Nom | HOLZMULLER | Prénoms | | Philippe | | Adresse | Rue | Grand Rue | Code postal et ville | | [3,4,5,6,0] POUSSAN | | Société d'appartenance (<i>facultatif</i>) | | IRD | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Nom | HOLZMULLER | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Prénoms | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Philippe | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Adresse | Rue | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Grand Rue | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Code postal et ville | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| [3,4,5,6,0] POUSSAN | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Société d'appartenance (<i>facultatif</i>) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IRD | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Nom</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> </tr> <tr> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> </tr> <tr> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">Code postal et ville</td> </tr> <tr> <td colspan="2">[]</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (<i>facultatif</i>)</td> </tr> </table> | | <input checked="" type="checkbox"/> Nom | | Prénoms | | | | Adresse | Rue | | Code postal et ville | | [] | | Société d'appartenance (<i>facultatif</i>) | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Nom | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Prénoms | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Adresse | Rue | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Code postal et ville | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| [] | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Société d'appartenance (<i>facultatif</i>) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Nom</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> </tr> <tr> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> </tr> <tr> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">Code postal et ville</td> </tr> <tr> <td colspan="2">[]</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (<i>facultatif</i>)</td> </tr> </table> | | <input checked="" type="checkbox"/> Nom | | Prénoms | | | | Adresse | Rue | | Code postal et ville | | [] | | Société d'appartenance (<i>facultatif</i>) | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Nom | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Prénoms | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Adresse | Rue | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Code postal et ville | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| [] | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Société d'appartenance (<i>facultatif</i>) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE <i>(Nom et qualité du signataire)</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mandataire : Chantal PEAUCELLE 92-1189 Paris, le 19 novembre 2003 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

BEST AVAILABLE COPY